บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 เครื่องมือ

1) เครื่องวัดความเป็นกรด–ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ OHAUS รุ่น STARTER 3100

2) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorious รุ่น BP 210 S

3) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorious รุ่น CP 3202 S

4) เครื่องอัลตร้าไวโอเลต–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectroscopy) ยี่ห้อ Genesys รุ่น 10 Series

5) เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (Hotplate and magnetic stirrer) ยี่ห้อ JENWAY

6) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Hettich รุ่น Universal 16

7) เครื่องผสมสารละลาย (Vertex Mixer) ยี่ห้อ genie 2 Scientific Industries

8) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memment

9) เครื่องระเหยตัวทำละลายสุญญากาศ (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi รุ่น R–124

10) เครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate Reader) ยี่ห้อ Metertech รุ่น 965+

11) ไมโครปิเปตต์ (Pipet-Lite XLS+) ขนาด 10, 20, 100, 200, 1000 ไมโครลิตร

3.2.2 สารเคมี

1) ไดโซเดียมไฮโดรเจนออโทฟอสเฟตแอนไฮดรัส (Disodium Hydrogen Orthophosphate anhydrous, Na_2HPO_4) บริษัท AJEX CHEMICALS, AR grade

2) โซเดียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟตไดไฮเดรต (Sodium dihydrogen Orthophosphate dehydrate, $Na_2HPO_4.2H_2O$) บริษัท AJEX CHEMICALS, AR grade

3) ไฮโดรคลอริก (Hydrochloric, HCl) บริษัท ZEN POINT, Commercial grade

4) แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate, $(NH_4)_2SO_4$) EMSURE, AR grade

5) โปรตีนอัลบูมิน (Bovine serum albumin) บริษัท HIMEDIA

6) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) บริษัท AJEX CHEMICALS, AR grade

7) กรดออร์โท-ฟอสฟอริก (ortho – Phosphoric acid) บริษัท AJEX FINECHEN, AR grade

8) เอทิลแอลกอฮอล์ แอนไฮดรัส (Ethyl alcohol anhydrous) บริษัท DAEJUNG, Reagent grade

9) เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase Enzyme) จากปลาไหลไฟฟ้า (Electrophorus electricus) บริษัท SIGMA CHEMICAL, AR grade

10) อะซิติลไทโอโคลีนไอโอไดด์ (Acetylthiocholine iodide) บริษัท SIGMA CHEMICAL, AR grade

11) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เกรดการค้าของบริษัทยูแอนด์วี โฮลดิ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด

12) เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) เกรดการค้าของบริษัทศรีเบญจาอินเตอร์เทรด จำกัด

13) เฮกเซน (Hexane) เกรดการค้าของบริษัทศรีเบญจาอินเตอร์เทรด จำกัด

14) เมทานอล (Ethanol) เกรดการค้าของบริษัทยูแอนด์วี โฮลดิ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด

15) ซิลิกาเจล (Silica gel 60) ของบริษัท SIGMA-ALDRICH เกรด 9385, pore size 60

16) ดีเอ็มเอสโอ (Dimethyl sulfoxide)

17) ยากลูโคเบย์ที่มีอะคาร์โบส (Acarbose, C25H43NO18) ยี่ห้อ Bayer Pharma AG ประเทศเยอรมนี

18) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-Amylase enzyme from porcine pancreas) ยี่ห้อ Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

19) แป้งมันฝรั่ง (Starch from potato) เกรด Analytical reagent, AR ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

20) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid)

21) ไอโอดีน (Iodine, I2) เกรด Analytical reagent, AR ยี่ห้อ Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย

22) ไดเมททิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO, C2H6OS) เกรด Analytical reagent, AR ยี่ห้อ Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

23) น้ำกลั่น

24) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) เกรด Analytical reagent, AR ยี่ห้อ ห้างหุ้นส่วนจากัด เคมีกิจ ประเทศไทย

25) เมทานอล (Methanol) บริษัท RCI Labscan, AR. Grade

26) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric Acid) เกรดการค้า ห้างหุ้นส่วนจำกัดเคมีกิจ

27) เอทานอล (Ethanol) เกรดการค้า ห้างหุ้นส่วนจำกัดเคมีกิจ

28) เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric Chloride) เกรดการค้า ห้างหุ้นส่วนจำกัดเคมีกิจ

29) แอมโมเนีย (Ammonia) เกรดการค้า ห้างหุ้นส่วนจำกัดเคมีกิจ

30) น้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent)

31) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เกรดการค้า บริษัทยูแอนด์วี โฮลดิ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด

32) บีเอชที (Butylated Hydroxytoluene) บริษัท PANREAC QUIMICA SA

33) ดีพีพีเอช (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) บริษัท TGI

34) กรดแกลลิก (Gallic acid) AR. Grade

35) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate) เกรดการค้า ห้างหุ้นส่วนจำกัดเคมีกิจ

36) โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, KI) เกรด Analytical reagent, AR ยี่ห้อ Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย

3.2 วิธีการดำเนินการ

3.2.1 การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าว

1) การเก็บตัวอย่าง ตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ใช้ในงานวิจัยมีทั้งหมดสองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ล้นยุ้งและนางพญาทองดำ เก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวสายพันธุ์ล้นยุ้งจากพื้นที่อำเภอแหลมสิงห์ และสายพันธุ์นางพญาทองดำจากพื้นที่อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี และนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ได้มาตากแดดลดความชื้นแล้วมาบรรจุลงในถุงซิปล็อคจากนั้นเก็บไว้ในพื้นที่ที่อากาศถ่ายเทได้สะดวก ป้องกันการสัมผัสแสงแดดและความชื้น หรือศัตรู เช่น มอด หนู เข้าทำลาย

2) การเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างข้าวทั้งสายพันธุ์ล้นยุ้งและนางพญาทองดำแยกเปลือกข้าวกับเมล็ดออกจากกันโดยใช้เครื่องโม่หินแล้วนำไปฟลัดด้วยกระด้ง จากนั้นบดข้าวโดยใช้ไนโตรเจนเหลวเติมลงไปเพื่อให้สะดวกต่อการบดได้ง่ายยิ่งขึ้นและนำไปปั่นให้มีความละเอียดและนำผงข้าวที่ได้ทั้งสองสายพันธุ์ไปร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาด 300 ไมครอน เก็บตัวอย่างใส่ถุงซิปล็อคแช่ตู้เย็นเพื่อทำการสกัดโปรตีนในขั้นต่อไป

3.2.2 การสกัดโปรตีนจากเมล็ดข้าวด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์

1) นำข้าวสายพันธุ์ล้นยุ้งและนางพญาทองดำที่บดละเอียด 300 ไมครอน จากข้อ 3.2.1 อย่างละ 1 กิโลกรัม สกัดด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วนน้ำหนักข้าวต่อปริมาตรบัพเฟอร์ 1 : 4 (กรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องกวนสาร (Stirrer) เป็นเวลา 20 นาที และสกัดต่อด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ในอัตราส่วนน้ำหนักข้าวต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ 1 : 4 (กรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องกวนสาร (Stirrer) เป็นเวลา 30 นาที

2) นำสารสกัดที่ได้ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนประมาณ 15 - 20 นาที แล้วนำส่วนสารละลายไปกรองด้วยผ้าขาวบางจากนั้นกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และเก็บส่วนที่เป็นสารละลาย

3) นำสารสกัดที่ได้ทั้งสายพันธุ์ล้นยุ้งและนางพญาทองดำมาหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ได้สารละลายที่ใสขึ้นเก็บสารละลายใส่ขวดใสแบบมีฝาปิด

4) นำส่วนที่เป็นกากข้าวแช่ด้วยตัวทำลายเมทานอลเป็นเวลา 14 วัน แล้วนำไประเหยตัวทำลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายสุญญากาศเก็บสารสกัดหยาบ ซึ่งเรียกว่าสารจากกากเมล็ดข้าวด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2.3 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0-80

1) นำสารสกัดที่ได้ทั้งสายพันธุ์ล้นยุ้งและนางพญาทองดำ จากข้อ 3.2.2 หมุนเหวี่ยง ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้ได้สารละลายที่ใส เก็บส่วนของสารละลายที่ใสใส่ขวดใสแบบมีฝาปิด

2) นำสารละลายที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 516 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง

3) เมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ครบตามเวลาที่กำหนด เก็บสารละลายส่วนที่ใสใส่ขวดแบบมีฝาปิด และนำไปแช่ตู้เย็น

4) นำส่วนที่เป็นสารแขวนลอย ละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่สองความเข้มข้นคือ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร เพื่อแยกเกลือและอนุภาคของสารอินทรีย์ขนาดเล็กออกจากสารสกัดหยาบโปรตีนแล้วเก็บเอาไว้คนละส่วนกับสารสกัดหยาบส่วนที่ใส

5) นำสารสกัดหยาบโปรตีนจากเมล็ดข้าวทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นต่อไป

3.2.4 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford)

1) ปิเปตต์สารสกัดหยาบโปรตีนจากข้าวพันธุ์นางพญาทองดำและล้นยุ้งใส่หลอดทดลองหลอดละ 40 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ไมโครลิตร ด้วยการเติมน้ำกลั่น Blank ใช้น้ำกลั่นเติมในหลอดเพื่อเป็น Blank แทนการเติมสารสกัดหยาบโปรตีน

2) เติมสารละลายแบรดฟอร์ดรีเอเจนต์ลงในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตร้าไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

4) คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ซึ่งเตรียมได้จากการนำสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปิเปตต์สารละลายใส่หลอดทดลองที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 40 60 และ 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายแบรดฟอร์ดรีเอเจนต์ลงในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปสร้างกราฟมาตรฐาน BSA

3.2.5 การสกัดสารจากกากเมล็ดข้าวด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

1) นำสารสกัดหยาบจากกากเมล็ดข้าวทั้งสายพันธุ์ล้นยุ้งและนางพญาทองดำละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 150 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยเครื่องกวนสาร (Stirrer) จนตะกอนละลายหมด

2) นำสารละลายสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ปริมาตร 50 มิลลิลิตรและเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก (Separatory funnel) จากนั้นเขย่าจะเกิดแรงดันให้ปล่อยอากาศออก ทำซ้ำจนไม่มีแรงดันอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นแล้วเก็บส่วนของสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารสุญญากาศเก็บส่วนสารสกัดหยาบแช่ตู้เย็น ส่วนสารละลายชั้นล่างจะเป็นชั้นน้ำนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อไป

3) นำสารละลายจากข้อ 2) สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก จากนั้นเขย่าจะเกิดแรงดันให้ปล่อยอากาศออก

ทำซ้ำจนไม่มีแรงดันอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นแล้วเก็บส่วนของสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารสุญญากาศ เก็บส่วนสารสกัดหยาบแช่ตู้เย็น ส่วนสารละลายชั้นบนจะเป็นชั้นน้ำนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท

4) นำสารละลายจากข้อ 3) สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก จากนั้นเขย่าจะเกิดแรงดันให้ปล่อยอากาศออก ทำซ้ำจนไม่มีแรงดันอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นแล้วเก็บส่วนของสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารสุญญากาศ เก็บส่วนสารสกัดหยาบแช่ตู้เย็น ส่วนสารละลายชั้นล่างจะเป็นชั้นน้ำเก็บแช่ตู้เย็น

5) นำสารสกัดหยาบจากกากเมล็ดข้าวทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอะเซติลโคลีนเอสเทอเรสและทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นต่อไป

3.2.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรรมเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านยับยั้งกิจกรรรมเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสนี้ สามารถทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาเคมีและอ่านผลด้วยวิธีทางสเปกโตรเมทรี (Spectrometry) ทำโดยใช้เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholine esterase) ชนิด Type VI-S ที่สกัดจากปลาไหลไฟฟ้า (Electrophorus electricus) และซับสเตรต (Substrate) คือ อะซิติลไทโอโคลีน และดีทีเอ็นบี (5,5′-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid; DTNB) ในการทดสอบฤทธิ์ เมื่อเริ่มปฏิกิริยาจะทำการบ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เกิดสารประกอบที่มีสีเหลือง แล้วจึงทำการตรวจวัดที่ 405 นาโนเมตร ดังวิธีการต่อไปนี้

1) หลุมปฏิกิริยา (Test Reaction) ทำโดยนำสารสกัดหยาบโปรตีนจากข้าว ความเข้มข้นปริมาณโปรตีนในช่วง 0.086-0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารสกัดหยาบจากกากข้าวที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตทความเข้มข้นในช่วง 1-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

2) เติมสารละลาย DTNB ความเข้มข้น 0.075 M ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

3) เติมสารละลายอะซิติลไทโอโคลีนไอโอไดด์ ความเข้มข้น 0.003 M ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

4) เติมสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้น 1.4 ยูนิตต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม โดยหลุม Blank จะไม่ใส่สารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ทำการปรับปริมาตรด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี DMSO ละลายอยู่ร้อยละ 1 โดยปริมาตร จนครบ 50 ไมโครลิตร

5) เริ่มจับเวลาตั้งแต่ใส่สารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ (25±1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที

6) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

7) บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคำนวณหาร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

8) หลุมควบคุมเชิงบวก (Positive control) ทำโดยนำสารมาตรฐานยาไรวาสติกมีนความเข้มข้นปริมาณโปรตีนในช่วง 0.00025-0.0015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำตามขั้นตอนข้อ 2-7 ปรับปริมาตรด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี DMSO ละลายอยู่ร้อยละ 1 โดยปริมาตรจนครบปริมาตร 50 ไมโครลิตร

9) หลุมควบคุมเชิงลบ (Negative control) ทำตามขั้นตอนข้อ 2-7 ปรับปริมาตรด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี DMSO ละลายอยู่ร้อยละ 1 โดยปริมาตรแทนสารสกัดจากพืชจนครบปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.2.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานอะคาร์โบสที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำยากลูโคเบย์ที่มีอะคาร์โบส 100 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียด แล้วละลายด้วยไดเมธิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย และนำไปปั่นแยกด้วย เครื่องหมุนเหวี่ยง เพื่อแยกตะกอน แล้วดูดสารละลายใสที่อยู่ด้านบนออกจากตะกอนด้านล่างแล้วปรับปริมาตรด้วยไดเมธิลซัลฟอกไซด์ให้ได้ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ให้ได้สารละลายมาตรฐานอะคาร์โบสที่ความเข้มข้น 1.25 2.50 3.75 1.50 5.00 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2) ปิเปตต์สารสกัดหยาบโปรตีนจากข้าวหรือสารละลายมาตรฐานอะคาร์โบสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายน้ำแป้งร้อยละ 1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ลงใน ไมโครเพลท และนำมาเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 0.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา และเติมสารละลายไอโอดีนร้อยละ 1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร และทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยจะแบ่งออกเป็นทั้งหมด 4 กลุ่ม จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Enzyme activity} = \frac{B-(C-A)}{B} \times 100$$

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (Control)

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมแบลงค์ (Control blank)

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างหรือชุดควบคุมเชิงบวก (Sample or Positive control)

%Inhibition = 100 – % Enzyme activity

คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (Half maximum inhibitory concentration, IC_{50}) จากสมการเส้นตรง y = mx + c ของกราฟแสดง

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบโปรตีนจากข้าวกับร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส

3.2.8 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ (1,1 diphenyl-2-picryhydrazyl) เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ DPPH$^{\bullet}$ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรมีสีม่วง เมื่อ DPPH$^{\bullet}$ ได้รับอิเล็กตรอน หรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจนจะเปลี่ยนเป็น DPPH-H เกิดเป็นสารสีเหลือง โดยดัดแปลงจากวิธีของจันทิมา นามโชติ และคณะ (2556) ดังนี้

1) ชั่งสารมาตรฐานบีเอชที 0.001 กรัม ลงหลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Microcentrifuge Tube) ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล AR grade 1000 ไมโครลิตร ได้สารละลายมาตรฐานบีเอชทีที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) วัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐานบีเอชที โดยใช้สารละลายมาตรฐานบีเอชที ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3) นำสารละลายมาตรฐานบีเอชที ความเข้มข้นเริ่มต้นมา 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม และเติมสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ชุดควบคุมเป็นสารละลายเมทานอลกับสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ จำนวน 3 ซ้ำ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านไมโครเพลท และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4) นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ดังภาคผนวก ข

5) นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้น จะได้สมการเส้นตรง และคำนวณหาค่า Inhibitory concentration 50 (IC_{50})

6) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างทั้ง 6 ชนิด โดยมีวิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานบีเอชที เพียงเปลี่ยนจากสารละลายมาตรฐานบีเอชทีเป็นสารสกัดตัวอย่างที่ละลายด้วยเมทานอล ยกเว้นสารสกัดเฮกเซนที่ต้องละลายตัวอย่างด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด ดังนี้

- สารสกัดหยาบจากข้าวล้นยุ้งตัวทำละลายเฮกเซน เตรียมที่ความเข้มข้น 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- สารสกัดหยาบจากข้าวล้นยุ้งตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เตรียมที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- - สารสกัดหยาบจากข้าวล้นยุ้งตัวทำละลายเมทานอล เตรียมที่ความเข้มข้น 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- สารสกัดหยาบจากข้าวนางพญาทองดำตัวทำละลายเฮกเซน เตรียมที่ความเข้มข้น 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- สารสกัดหยาบจากข้าวนางพญาทองดำตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เตรียมที่ความเข้มข้น 150, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- สารสกัดหยาบจากข้าวนางพญาทองดำตัวทำละลายเมทานอล เตรียมที่ความเข้มข้น 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7) คำนวณค่า IC_{50} ของตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานบีเอชที

3.2.9 การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

สารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่ตรวจสอบของสารสกัดหยาบจากข้าวสายพันธุ์ล้นยุ้ง และนางพญาทองดำ ที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แอนทราควิโนน และเทอร์พีนอยด์ โดยดัดแปลงจากวิธีของสุนิษา สุวรรณเจริญ และคณะ (2560) ดังนี้

1) การตรวจสอบฟีนอลิก

- ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่น แล้วกรองสารละลาย จากนั้นเติม 1% (v/v) สารละลายเฟอริกคลอไรด์ 2-3 หยด ลงไปในหลอดทดลอง หากปรากฏสีเขียวปนดำ เขียวปนน้ำตาล ดำปนน้ำตาล ม่วง หรือน้ำเงินปนดำ แสดงว่าพบสารประกอบฟีนอลิก

2) การตรวจสอบแอลคาลอยด์

- ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม ละลายด้วย 2% (v/v) สารละลายกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นประมาณ 2-3 นาที กรอง จากนั้นนำของเหลวที่กรองได้ไปหยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟ หากปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

3) การตรวจสอบฟลาโวนอยด์

- ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้มและหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ถ้าให้สารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดงแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

4) การตรวจสอบแอนทราควิโนน

- ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม เติม 10% (v/v) สารละลายกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่น 5 นาที กรอง แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติม 10% (v/v) สารละลายแอมโมเนีย 2-3 หยด หากเกิดสีชมพูถึงแดงในชั้นด่างแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

5) การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์

- ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski test) ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

6) การตรวจสอบซาโปนิน

- ใช้การทดสอบฟองโดยชั่งสารสกัด 0.02 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด กรอง และนำของเหลวที่กรองมาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟองเกิดขึ้นแสดงว่าพบซาโปนิน

7) ทดสอบกรดอะมิโนและโปรตีน

- ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม เติมสารละลายนินไฮดรินที่เตรียมใหม่ ๆ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดประมาณ 1 นาที ปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลง เป็นปฏิกิริยาการทดสอบโปรตีนและกรดอะมิโนที่มีเอมีน และคาร์บอกซิลิก ในสารละลายที่เป็นกลางจะได้สีชมพูม่วงและสีน้ำเงิน ขึ้นกับชนิดของโปรตีน ยกเว้นกรดอะมิโนโปรลีน (Proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) ซึ่งจะให้สีเหลือง

8) ทดสอบไขมัน

- นำสารสกัดหยาบของข้าวสายพันธุ์ล้นยุ้ง และนางพญาทองดำ หยดใส่กระดาษซับมัน 1 หยด สีกระดาษก่อนทดสอบมีลักษณะทึบแสง หากหลังการทดสอบสีของกระดาษมีลักษณะโปร่งแสงแสดงว่ามีไขมัน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี